



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 G01N 21/75, 21/78, 21/27</p>	<p>AI</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/32198</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月4日(04.09.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00513</p> <p>(22) 国際出願日 1997年2月24日(24.02.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/41805 1996年2月28日(28.02.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡崎茂俊(OKAZAKI, Shigetoshi)[JP/JP] 松本浩幸(MATSUMOTO, Hiroyuki)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiaki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: METHOD AND APPARATUS FOR ASSAYING ENZYMIC REACTION</p> <p>(54)発明の名称 酵素反応測定方法及びその測定装置</p> <div data-bbox="323 760 743 1015"> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>A method and apparatus for determining enzyme activities by supplying a substrate solution and an enzyme solution to a reaction vessel to which a total reflection absorption prism is connected. An assay solution (40) comprising a mixture of an enzyme solution and a substrate solution is brought to a constant temperature in a reaction vessel (26) by a thermostat (23) and stirred by an agitator (21). An infrared ray (36) sent out of an infrared ray source (3) enters an interface between the side of the prism (28), and is totally reflected thereupon. The spectrum of the totally reflected, outgoing transmitted infrared ray (37) is detected by an infrared ray detector (5), and the variation of the infrared ray absorption spectrum or absorbance is determined on the basis of what has been detected, whereby the enzyme reaction in the object solution (40) is assayed.</p>		

## (57) 要約

全反射吸収用プリズムを結合させた反応容器に基質溶液と酵素溶液とを供給することにより酵素活性を測定する方法および装置である。酵素溶液と基質溶液とが混合されてなる測定溶液(40)は、反応容器(26)内で温度制御装置(23)により一定温度とされ、また、攪拌装置(21)により攪拌される。赤外光源(3)から出射された赤外光(36)は、測定溶液(40)に接して配された全反射吸収用プリズム(28)と測定溶液(40)との界面に全反射吸収用プリズム(28)の側から入射して全反射する。その全反射して出射された透過赤外光(37)のスペクトルが赤外光検出器(5)により検出されて、これに基づいて、赤外線吸収スペクトルまたは吸光度の変化が求められ、測定溶液(40)中の酵素反応が測定される。

## 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	エストニア	LS	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BY	ベラルーシ	GU	グアム	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	SZ	スワジランド
CA	カナダ	HK	香港	ML	マリ	TD	チャド
CC	ココス(キリング)諸島	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CD	コンゴ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CE	コート・ジボワール	IT	イタリア	MO	モロッコ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CH	スイス	KR	韓国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KW	クウェート	NO	ノルウェー	US	米国
CM	カメルーン	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル	VN	ベトナム
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LK	スリランカ				
DK	デンマーク						

## 明 細 書

## 酵素反応測定方法及びその測定装置

## 技術分野

本発明は、反応容器内に基質溶液と酵素溶液とを供給することにより反応を行わせ、その酵素反応を連続的に赤外分光法により観測する酵素反応測定方法及びその測定装置に関する。

## 背景技術

酵素は、生物の生産する一種の触媒であり、主に蛋白質からなっている。酵素が触媒する反応の反応物質は基質と呼ばれる。生体内のほとんど全ての反応にそれぞれ応じた酵素が存在しており、それら酵素反応は、生体内の穏和な条件下で円滑に行われ、生命の維持に役立っている。従って、生体内反応に関与している酵素の働き（酵素活性）の低下は疾患の原因となり得るため、血液や尿のある種の酵素の活性を測定することにより病気の診断を行うことが、臨床検査の場では広く行われている。

また、酵素反応は、基質特異性が高く、省エネルギー型の工業プロセスとしても広く利用されている。例えば、油脂化学工業においては、油脂の分解にリパーゼが用いられている。リパーゼは、長鎖脂肪酸のグリセロールエステル（トリグリセリド）を加水分解する酵素であり、消化管内のリパーゼは、主に膵臓に由来し、一部胃や腸からも分泌される。膵疾患においては血中リパーゼ活性が上昇することが知られており、血中のリパーゼ活性を測定することにより膵疾患の判定がなされている。

酵素反応を測定することは、酵素が触媒する反応の反応物質である基質およびその反応によって生成される生成物それぞれの量的および時間的な変化を測定す

ることである。すなわち、基質が生成物へと変化する割合が大きいかほど酵素活性は高いことになる。逆にその割合が小さいほど酵素活性は低いことになる。また、基質の生成物への変化を経時的に測定することで、酵素反応の反応速度を解析することが可能となる。

従来より、基質と生成物の量的な変化を測定する方法は、基質と生成物の物理的あるいは化学的性質の違いを利用して識別することにより、それぞれの量的な変化を測定している。例えば、(1) 酵素反応停止後に基質あるいは生成物を特異的に発色させて比色定量することにより、基質あるいは生成物の増減量を求める方法（比色定量法）、(2) 放射性同位元素で標識された化合物（放射性化合物）を基質として用い、酵素反応により生じる生成物が別の放射性化合物となることを利用して、それぞれの放射性化合物を分離し、放射エネルギーを測定することにより、基質あるいは生成物の増減量を求める方法、(3) 酵素反応により生成した脂肪酸を反応停止後に中和滴定する方法（滴定法）、(4) 基質を水に懸濁させ、酵素反応により基質が分解されることによる基質溶液の濁度の変化を測定することにより、基質の増減量を求める方法（濁度測定法）、あるいは、(5) 基質と生成物の分光学的な違いを利用し、それぞれの物質が特異的に吸収する波長の光（吸収波長）を用い、吸光度の変化から基質あるいは生成物の増減量を求める方法（分光学的測定法）などがある。このうち特に、分光学的測定法および濁度測定法は、連続的に酵素反応を測定することが可能である。

しかし、上記測定方法それぞれには以下のような問題点がある。まず、比色定量法は、酵素反応停止後に基質あるいは生成物を特異的に発色させるため発色試薬を反応させなければならず、操作が煩雑かつ測定に時間がかかり、連続的な酵素反応の測定を行うことができない。さらに、基質が水懸濁液である場合、光を透過させることが困難であり、十分な測定が行えないという問題点がある。

放射性元素を用いる方法は、酵素反応を停止させた後に基質あるいは生成物を分離して、放射エネルギーを測定するために、操作が煩雑であり測定に時間を要する上、

連続的な酵素反応の測定が不可能である。また、放射性同位体を使用するため、安全面での問題点や使用する場所の制限が大きいという問題点がある。

滴定法は、酵素反応停止後に基質と生成物を分離することなく測定可能であるが、連続的な酵素反応の測定ができないという問題点がある。

濁度測定法は、操作が容易で酵素反応の連続的測定が可能であるが、観測しているものが、基質自体ではなく、懸濁している基質からの散乱光である。したがって、この方法は、酵素反応自体を観測していないため、信頼性に問題がある。

一方、分光学的測定法は、基質あるいは生成物を分離することなく、簡便かつ連続的に酵素反応を測定することが可能であるという点で有用な手段である。しかしながら、測定する溶液が濁度を持つ場合、特に基質が水溶性でない場合には、定量的な測定が困難であるという問題があり、従来このような水溶液中で、しかも濁った試料での応用例は無かった。特に測定波長が紫外領域から可視領域の場合、上記濁度の影響は大きいものである。さらには測定波長が赤外光の場合には、濁度による影響はむしろ小さくなるが、赤外領域においては溶媒たる水の吸収が大きく、数百ミクロン程度の厚さのセルを用いるか、全反射吸収法（平石次郎編「フーリエ変換赤外分光法」学会出版センター、(1985) pp.163-171）を用いなければならないことが知られている。

しかし、分光学的測定法の酵素反応への応用に際しては、酵素反応の攪拌速度の依存性等のために厳密な攪拌が必要とされるが、上記数百ミクロン程度の厚さのセルでは攪拌が不可能であった。さらに、通常的全反射吸収法測定装置も、攪拌することができないため、正確な酵素活性の測定ができないものであった。

本発明は、分光学的測定法に基づく上記の本質的な問題をなくすためになされたものであり、基質と生成物との分離が不要、操作が容易、酵素反応の連続測定が可能、かつ、信頼性の高い酵素反応の測定が可能な酵素反応測定方法及びその測定装置を供給することを目的とするものである。

## 発明の開示

本発明に係る酵素反応測定方法は、酵素と基質とを含む測定溶液を一定温度の下で攪拌し、測定溶液に接して配された全反射吸収用プリズムと測定溶液との界面に全反射吸収用プリズムの側から赤外光を入射させて全反射させ、その全反射された赤外光のスペクトルを測定して赤外線吸収スペクトルまたは吸光度の変化を求め、測定溶液中の酵素反応を測定することを特徴とする。

このようにすることによって、測定溶液が濁度を持つ場合や基質が水溶性でない場合であっても、基質と生成物とを分離することなく、簡便な操作で連続的に、信頼性の高い酵素反応の測定が可能となる。

ここで、酵素は、エステル結合の加水分解反応を触媒することを特徴とするものであり、カルボン酸エステル加水分解酵素またはリパーゼである。

また、本発明に係る酵素反応測定装置は、基質溶液と酵素溶液とが混合される測定溶液を容れる反応容器と、基質溶液を反応容器内に供給する基質溶液供給手段と、酵素溶液を反応容器内に供給する酵素溶液供給手段と、測定溶液の温度を制御する温度制御手段と、測定溶液を攪拌する攪拌手段と、測定溶液に接して配された全反射吸収用プリズムと、全反射吸収用プリズムと測定溶液との界面で全反射するように赤外光を全反射吸収用プリズムに入射させる赤外光源と、全反射吸収用プリズムから出射された赤外光のスペクトルを測定する赤外光検出手段と、赤外光検出手段により測定された赤外光のスペクトルに基づいて赤外吸収スペクトルあるいは吸光度の変化を求めて測定溶液中の酵素反応を測定する演算部と、を備えることを特徴とする。

このことによって、基質溶液供給手段および酵素溶液供給手段それぞれから反応溶液に供給された基質溶液および酵素溶液それぞれは反応溶液内で混合されて測定溶液とされ、その測定溶液は、温度制御手段により一定温度に制御され、攪拌手段により攪拌される。赤外光源から出射された赤外光は、この測定溶液に接して配された全反射吸収用プリズムと測定溶液との界面に全反射吸収用プリズム

の側から入射して全反射し、その全反射された後に全反射吸収用プリズムから出射した赤外光のスペクトルは、赤外光検出手段により測定される。そして、演算部により、赤外線吸収スペクトルまたは吸光度の変化が求められ、測定溶液中の酵素反応が測定される。したがって、測定溶液が濁度を持つ場合や基質が水溶性でない場合であっても、基質と生成物とを分離することなく、簡便な操作で連続的に、信頼性の高い酵素反応の測定が可能となる。

また、本発明に係る酵素反応測定装置は、反応容器内の測定溶液を排出する溶液排出手段と、反応容器内を洗浄する洗浄液を反応容器内に供給する洗浄液供給手段と、を更に備えることを特徴とする。このことによって、1つの酵素反応の測定が終了した後、反応容器内の測定溶液は、溶液排出手段により排出され、また、反応容器内は、洗浄液供給手段により供給された洗浄液により洗浄されるので、続けて次の酵素反応の測定が可能となる。

また、全反射吸収用プリズムは、少なくとも測定溶液に接触する領域がテフロン・コーティングされていることを特徴とする。このことによって、測定溶液中の基質が全反射吸収用プリズムに析出することが防止される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明に係る酵素反応測定装置の構成図であり、第2図は、本装置の反応容器の斜視図であり、第3図は、本装置の反応容器の断面図であり、第4図は、本装置の測定動作のフローチャートであり、第5図は、本装置を用いたリパーゼによるオリーブ油の加水分解反応の結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説述するために、添付の図面に従ってこれを説明する。

第1図は、本発明に係る酵素反応測定装置の一実施形態を示す構成図であり、本装置の構成を明確にするため反応容器26については断面図を示している。こ

の実施の形態においては分光器を使用した赤外分光光度計を示しているが、フーリエ変換型赤外分光光度計または目的波長のみの光を発する光源と検出器の組み合わせを使用したものでも良い。

この酵素反応測定装置は、主に、赤外分光光度計本体 1 および赤外分光光度計試料室 2 を備え、更に、洗浄液、基質溶液、酵素溶液および停止液それぞれの供給部 15～18 等をも備えている。赤外分光光度計本体 1 内部には、赤外光源 3、分光器 4、赤外光検出器 5、および、これらを制御する制御部 6 が内蔵されている。また、赤外分光光度計試料室 2 内部には、主に、反応容器 26 および全反射吸収用プリズム 28 が内蔵されている。

赤外光源 3 は、赤外光を出射する光源であり、この赤外光源 3 から出射された赤外入射光 36 は、全反射吸収用プリズム 28 の入射面に入射する。この全反射吸収用プリズム 28 は、上面と下面（反応容器 26 の側の面）とが平行であって、これらに対して入射面および出射面が斜めに形成されている。この全反射吸収用プリズム 28 の入射面に入射した赤外光は、全反射吸収用プリズム 28 の上面と下面との間を全反射を繰り返しながら伝搬し、出射面から出射する。

この全反射吸収用プリズム 28 は、屈折率が高い ZnSe 製が最も好適であり、Ge 製または Si 製も好適である。また、赤外光の全反射吸収用プリズム 28 の下面への入射角は、40 度から 60 度の範囲が好適であり、特に 45 度が好ましい。なお、全反射吸収用プリズム 28 の屈折率と測定溶液 40 の屈折率との差が小さいほど、赤外光が全反射吸収用プリズム 28 の下面で全反射する際に測定溶液 40 中に発生するエバネセントの染み込みは深くなり、基質による赤外吸収スペクトルが増強されることになる。

さらに、全反射吸収用プリズム 28 は、その下面のうち少なくとも測定溶液 40 と接する領域が、テフロン・コーティングされているのが好適である。このようにするテフロン・コーティングすることで、測定溶液 40 中の基質が全反射吸収用プリズム 28 に析出することを防止できる。なお、赤外光が全反射吸収用プ



リズム 28 の下面で全反射する際に測定溶液 40 中に生じるエバネセント波の染み込み深さは、その赤外光の波長の  $1/5$  から  $1/7$  程度であり、また、目的波長が約  $7\mu\text{m}$  であるので、赤外光のエバネセントが測定溶液 40 に達するようにするためには、テフロン・コーティングの厚みは数百 nm 以下であることが必要である。

全反射吸収用プリズム 28 の出射面から出射された赤外透過光 37 は、分光器 4 に入射する。この分光器 4 は、その赤外透過光 37 のうちの目的波長成分を選択し、赤外光検出器 5 は、その目的波長成分を検出し、その強度に応じた信号を出力する。そして、赤外光検出器 5 により検出された信号は、制御部 6 およびデータ転送ライン 39 を経て、演算・制御用コンピュータ 7 に転送される。なお、電源 32 は、赤外分光光度計本体 1 内の赤外光源 3、分光器 4、赤外光検出器 5 および制御部 6 それぞれに電力を供給するためのものである。

全反射吸収用プリズム 28 は、パッキン 27 を介して反応容器 26 に取り付けられており、全反射吸収用プリズム 28 の下面の一部領域は、反応容器 26 内に容れられる測定溶液 40 と接する。このパッキン 27 は、全反射吸収用プリズム 28 と測定溶液 40 とが接する領域の面積を規定するため孔が中央部に設けられている。

このパッキン 27 は、測定する波長領域に吸収のないもの、すなわち、エステル基およびカルボキシル基を含まない材質（例えば、シリコンゴムまたはテフロン製）のものが好ましい。また、パッキン 27 として、全反射吸収用プリズム 28 と反応容器 26 とを接するシリコンゴム系接着剤であっても良い。また、全反射吸収用プリズム 28 の下面のうち測定溶液 40 と接する領域以外の領域に金属（例えば、アルミニウム、金、など）を蒸着して、この蒸着膜をパッキン 27 としても良い。

反応容器 26 は、測定溶液 40（具体的には、基質溶液および酵素溶液）を容れるための容器である。全反射吸収用プリズム 28 に接する反応容器 26 の側面

には、測定溶液 40 と全反射吸収用プリズム 28 の下面とを接触させるための孔が設けられており、その孔は、パッキン 27 に設けられた孔と対応する位置にある。反応容器 26 の材質は、テフロンまたは表面をテフロン・コーティングしたアルミニウムが好ましい。なお、この反応容器 26 の内部空間と赤外分光光度計試料室 2 の内部空間とは物理的に遮断されており、測定溶液 40 と赤外分光光度計試料室 2 とは直接接触することはない。

反応容器 26 内には、攪拌回転子 22 が設けられている。この攪拌回転子 22 は、反応容器 26 内における酵素反応の条件を一定にするために測定溶液 40 を一定速度で攪拌するためのものであり、磁気式攪拌装置本体 21 の指示により回転し、また、その回転速度は、磁気式攪拌装置制御部 20 により一定速度に制御される。なお、電源 34 は、磁気式攪拌装置制御部 20 に電力を供給するためのものである。

反応容器 26 の他の側面には、パネルヒータ 24 が設けられている。このパネルヒータ 24 は、反応容器 26 内における酵素反応の温度条件を一定するために、測定溶液 40 を一定温度に保つためのものである。また、反応容器 26 内には、温度センサ 25 が設けられている。この温度センサ 25 は、反応容器 26 内の測定溶液 40 の温度を測定するためのものである。また、温度制御装置 23 は、温度センサ 25 により測定された反応容器 26 内の測定溶液 40 の温度に基づいてパネルヒータ 24 を制御して、反応容器 26 内の測定溶液 40 の温度を所定値に維持するためのものである。なお、電源 35 は、温度制御装置 23 に電力を供給するためのものである。

また、反応容器 26 には、空気排出部 29、溶液供給用パイプ 30 および溶液排出用パイプ 31 それぞれが接続されている。

空気排出部 29 は、反応容器 26 内へ各種溶液が供給される時に反応容器 26 内部より押し出される空気を排出するためのものであり、反応溶液 26 の内部空間から赤外分光光度計試料室 2 の外部まで導かれており、その途中に電磁弁 13

が設けられている。

溶液供給用パイプ 30 は、洗浄液、基質溶液、酵素溶液および停止液それぞれを供給するためのパイプである。この溶液供給用パイプ 30 には、洗浄液を供給するための洗浄液供給部 15、基質溶液を供給するための基質溶液供給部 16、酵素溶液を供給するための酵素溶液供給部 17、および、停止液を供給するための停止液供給部 18 それぞれが、電磁弁 8 乃至 11 それぞれを介し、更に電磁弁 12 を介して接続されている。

溶液排出用パイプ 31 は、反応容器 26 内の測定溶液 40 を排出するためのパイプであり、電磁弁 14 を介して、溶液排出部 19 に接続されている。この溶液排出部 19 は、反応容器内 26 内部の測定溶液 40 を吸引することにより、測定溶液 40 を排出する。

これら電磁弁 8 乃至 14、洗浄液供給部 15、基質溶液供給部 16、酵素溶液供給部 17、停止液供給部 18 および溶液排出部 19 は、制御・電源供給ライン 38 を介して演算・制御用コンピュータ 7 に接続されており、演算・制御用コンピュータ 7 より制御される。電源 33 は、演算・制御用コンピュータ 7 に電力を供給するためのものである。尚、洗浄液供給部 15、基質溶液供給部 16、酵素溶液供給部 17 および停止液供給部 18 それぞれは、演算・制御用コンピュータ 7 の指示に基づいて、一定量の各溶液を溶液供給用パイプ 30 に送り出した後、空気または不活性気体（例えば窒素ガス等）を一定量送り出し、溶液供給用パイプ 30 内に各溶液が残ることなく定量的に反応容器 26 内部に各溶液を供給できる構造となっている。

図 2 は、反応容器 26、パッキン 27 および全反射吸収用プリズム 28 を斜め上方から見たときの斜視図であり、図 3 は、全反射吸収プリズム 28 の下面に垂直な面で切断したときのこれらの断面図である。なお、これらの図は、反応容器 26、パッキン 27 および全反射吸収用プリズム 28 それぞれの実際の配置の方位を示している。

これらの図に示すように、反応容器 26 の一方の側面には孔が設けられており、その孔が全反射吸収用プリズム 28 のテフロン・コーティングされた面で塞がれる構造となっている。反応容器 26 の下部には磁気式攪拌装置 21 が設けられ、また、反応容器 26 内部には攪拌回転子 22 が設けられている。また、空気排出部 29、溶液供給用パイプ 30 および溶液排出用パイプ 31 は、反応容器 26 の上方より、反応容器 26 の内部空間に導かれており、そのうち、空気排出部 29 および溶液供給用パイプ 30 それぞれの先端は、反応容器 26 の内部空間の上面近傍まで導かれ、溶液排出用パイプ 31 の先端は、反応容器 26 の内部空間の底面近傍まで導かれている。

次に、上記構成の酵素反応測定装置を用いた酵素反応測定方法を説明する。図 4 は上記構成の装置における測定動作のフローチャートの一例である。以下、図 4 に従って測定動作を説明する。なお、図 4 は、測定検体数が 5 検体であって、各検体毎に酵素反応を 1 分間隔で 11 回測定するためのフローチャートである。また、以下の処理は、演算・制御用コンピュータ 7 の指示に従って行われるものである。

まず、ステップ S1 では、安定した測定を行うために、装置の全ての電源 32 乃至 35 は予め測定開始前にオンにされ、装置は初期化設定される。すなわち、赤外分光光度計試料室 2 内は予め乾燥空気または窒素でパージされ、温度制御装置 23 により反応容器 26 内の反応温度が設定され、磁気式攪拌装置制御部 20 により攪拌回転子 22 の攪拌速度が設定される。また、演算・制御用コンピュータ 7 において、検体数 S を数えるカウンタ及び測定回数 N を数えるカウンタそれぞれは値 0 に初期化される。なお、この時点において、本装置の全ての電磁弁 8 乃至 14 は閉じられている。

続くステップ S2 では、電磁弁 13、電磁弁 12 及び電磁弁 9 それぞれが開かれ、基質溶液供給部 16 より一定量の基質溶液が溶液供給用パイプ 30 を通して反応容器 26 内に供給され、その後、一定量の窒素ガスが供給されて、定量的に

基質溶液が反応容器 26 内に供給された後、電磁弁 9 および電磁弁 12 が閉じられる。ステップ S3 では、反応容器 26 内の基質溶液が設定温度になるよう、装置は 10 分間放置される。

次にステップ S4 では、基質溶液のみの赤外吸収スペクトルがバックグラウンドとして測定される。すなわち、赤外光源 3 から出射した赤外入射光 36 が全反射吸収用プリズム 28 の入射面に入射し、その赤外光は全反射吸収用プリズム 28 の上面および下面の間で全反射しながら伝搬し、全反射吸収用プリズム 28 の出射面から出射した赤外透過光 37 の各波長成分が分光器 4 により選択されて赤外光検出器 5 により検出される。

このとき、全反射吸収用プリズム 28 の下面は反応容器 26 内の基質溶液と接しているので、赤外光が全反射吸収用プリズム 28 の下面で全反射すると、そのエバネセントが基質溶液に発生する。しかも、全反射吸収用プリズム 28 の上面および下面の間で赤外光は全反射を繰り返すので、全反射吸収用プリズム 28 の下面と基質溶液とが接する広い領域に亘ってエバネセントが発生する。したがって、全反射吸収プリズム 28 の出射面から出射された赤外透過光 37 は、基質溶液による吸収の影響を強く受けたものとなる。ステップ S5 では、このようにして得られたバックグラウンドの赤外吸収スペクトルのデータが、制御部 6 を経て演算・制御用コンピュータ 7 に転送される。

次にステップ S6 では、電磁弁 12 および電磁弁 10 が開かれ、酵素溶液供給部 17 より一定量の検体である酵素溶液が溶液供給用パイプ 30 を通して反応容器 26 内に供給され、その後、一定量の窒素ガスが供給されて、定量的に基質溶液が反応容器 26 内に供給される。その後、電磁弁 10 および電磁弁 12 は閉じられる。

次にステップ S7 では、基質溶液と酵素溶液とが混合された測定溶液 40 について赤外吸収スペクトルが測定される。その測定は、ステップ S4 の場合とほぼ同様である。ただし、ステップ S7 における測定対象は、基質溶液と酵素溶液と

が混合された測定溶液 40 であって、攪拌回転子 22 により一定回転速度で攪拌されて懸濁状態となっている。しかし、このような場合であっても、赤外光が全反射吸収用プリズム 28 の下面で全反射すると、そのエバネセントが測定溶液 40 内に発生する。この場合、全反射吸収用プリズム 28 の出射面から出射された赤外透過光 37 は、基質と酵素との反応により減少した基質の影響を受けたものとなる。

ステップ S8 では、ステップ S7 で測定されたスペクトルデータが、制御部 6 を経て演算・制御用コンピュータ 7 に転送される。そして、演算・制御用コンピュータ 7 により、そのスペクトルデータとステップ S5 で既に転送されたバックグラウンド・スペクトルデータとの差が求められる。

次にステップ S9 では、装置は 1 分間放置され、ステップ S10 では、測定回数カウンタ N と値 10 とが大小比較され、測定回数カウンタ N が値 10 以下である場合にはステップ S11 に進み、そうでない場合にはステップ S12 に進む。ステップ S11 では、測定回数カウンタ N に値 1 が加算され、ステップ S7 のスペクトル測定に戻る。すなわち、ステップ S7 乃至 S11 からなるループにおいて、測定溶液 40 についてスペクトルデータが 1 分毎に計 11 回測定され、かつ、そのスペクトルデータとバックグラウンド・スペクトルデータとの差が求められる。

ステップ S12 では、電磁弁 14 が開かれ、溶液排出部 19 により反応容器 26 内の測定溶液 40 が排出される。ステップ S13 では、電磁弁 12 及び電磁弁 8 が開かれ、洗浄液供給部 15 より洗浄液が溶液供給用パイプ 30 を通して反応容器 26 に供給され、反応容器 26 内が十分に洗浄された後、電磁弁 13 が閉じられる。そして、一定量の窒素ガスが供給され、反応容器 26 内にある洗浄液が完全に排出された後、電磁弁 8、電磁弁 12 および電磁弁 14 が閉じられる。以上で、1 検体について測定が終了する。

次にステップ S14 では、検体数カウンタ S と値 5 とが比較され、検体数カウンタ S が値 5 未満の場合には、ステップ S15 に進み、そうでない場合には、測

定は全て終了する。ステップS15では、測定回数カウンタNが値0に設定されるとともに、検体数カウンタSに値1が加算され、ステップS2に戻る。すなわち、ステップS2乃至S15からなるループにおいて、5検体それぞれにつき、測定溶液40についてスペクトルデータが1分毎に計11回測定され、かつ、そのスペクトルデータとバックグラウンド・スペクトルデータとの差が求められる。

したがって、以上の操作が行われることにより、演算・制御用コンピュータ7には、5検体の酵素による酵素反応による赤外吸収スペクトルの1分ごとの変化が得られ、その変化量より各酵素の酵素活性の解析が可能となり、また、赤外吸収スペクトルの経時変化より各酵素の反応速度論的解析が可能となる。

次に、実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。以下に上記の装置で測定した酵素反応測定の実施例を示す。

使用された試薬は、①オリブ油（リパーゼ測定用特製試薬）、ナカライテスク社製、②ポリビニルアルコール（クラレポバル、PVA-117）、クラレ社製、③ポリビニルアルコール（クラレポバル、PVA-205）、クラレ社製、および、④リパーゼOF（360,000 U/g）、名糖産業社製、である。

ポリビニルアルコール溶液の調製は以下に行われた。すなわち、ポリビニルアルコール（クラレポバル、PVA-117）18.5gとポリビニルアルコール（クラレポバル、PVA-205）1.5gとが、500ml程度のMilliQ水と混合されて、スターラーで攪拌され、その後、オートクレーブ（121℃、2～3分間）処理され、更にスターラーで攪拌されて完全に溶解された。そして、この混合液は、室温まで冷却された後、MilliQ水が加えられて総量1リットルとされ、さらに攪拌された後、濾過されて室温保存された。

酵素溶液用バッファ（0.1Mりん酸バッファ）の調製は以下に行われた。すなわち、りん酸二水素ナトリウム（無水）2.4gがMilliQ水に溶解されて、最終的に200mlのMilliQ水とされた。また、りん酸水素二ナトリウム（無

水) 7.1 g が MilliQ 水に溶解されて、最終的に 500 ml の MilliQ 水とされた。次に、上記りん酸二水素ナトリウム溶液 200 ml は、容量 500 ml あるいは 1 リットルのビーカに容れられて、pH メータにセットされ、これにりん酸水素二ナトリウム溶液が加えられて、pH が 7.0 になるよう設定された。そして、これが濾過されて冷蔵保存された。

オリーブ油エマルションの調製は以下のように行われた。すなわち、オリーブ油 (リパーゼ測定用特製試薬) 20 ml とポリビニルアルコール溶液 60 ml とが、容量 150 ミリリットルの容器に計り取られ、その容器の周りが氷でおおわれて冷却されながら、攪拌機で攪拌 (2000 回転/分で 10 分間) された後、氷冷下で 1 時間放置された。

酵素溶液の調製は以下のように行われた。すなわち、リパーゼ OF (360,000 U/g) 0.028 g が計り取られ、容量 10 ml のプラスチック試験管に入れて、これに酵素溶液用バッファ 10 ml が加えられ、泡立たないようにして転倒混和 (1,000 U/ml) されて、氷冷保存された。

そして、以上のようにして調整された基質溶液 (オリーブ油エマルション溶液、酵素溶液用バッファ) および酵素溶液について、本実施形態に係る酵素反応測定装置および装置により酵素反応が測定された。なお、反応容器 26 内の測定溶液 40 の温度は、温度制御装置 23、パネルヒータ 24 および温度センサ 25 により、37℃に設定された。また、攪拌回転子 22 の攪拌速度は、磁気式攪拌装置制御部 20 および磁気式攪拌装置本体 21 により、約 1000 回転/分に設定された。

まず、反応容器 26 内に、基質溶液としてオリーブ油エマルション溶液 2 ml および酵素溶液用バッファ 1.6 ml が供給され、10 分間放置された後、バックグラウンド測定され、バックグラウンド・スペクトルデータが得られた。次に、反応容器 26 内に、酵素溶液 0.4 ml が供給され、20 分間に亘り 1 分間隔で計 21 回、スペクトル測定され、赤外吸収スペクトルデータが得られた。



そして、酵素溶液と基質溶液とが混合された測定溶液についての赤外吸収スペクトルデータは、バックグラウンド・スペクトルデータが差し引かれ、酵素反応の反応速度は、この結果に基づいて得られる。図5は、バックグラウンドが減算された赤外吸収スペクトルのうち、波数 $1745\text{ cm}^{-1}$ における吸光度の変化を示すものである。本実施形態に係る酵素反応測定装置による測定結果は、別個に滴定法によって測定した結果とも良く一致し、本装置を用いて酵素反応の測定が可能であることがわかる。

#### 産業上の利用可能性

以上のように本発明に係る酵素反応測定方法及びその測定装置は、測定溶液が濁度を持つ場合や基質が水溶性でない場合であっても、基質と生成物とを分離することなく、簡便な操作で連続的に、信頼性の高い酵素反応の測定が可能となる。したがって、本発明に係る酵素反応測定方法及びその測定装置は、臨床検査の場において、血液中や尿中の或種の酵素活性を測定することによる病気の診断や、血液中のリパーゼ活性を測定することによる膵疾患の判定に用いるのに好適であり、また、油脂化学工業等の工業プロセスにおいても、油脂とリパーゼとの反応速度の測定に好適に用いられる。

## 請 求 の 範 囲

1. 酵素と基質とを含む測定溶液を一定温度の下で攪拌し、前記測定溶液に接して配された全反射吸収用プリズムと前記測定溶液との界面に前記全反射吸収用プリズムの側から赤外光を入射させて全反射させ、その全反射された赤外光のスペクトルを測定して赤外線吸収スペクトルまたは吸光度の変化を求め、前記測定溶液中の酵素反応を測定することを特徴とする酵素反応測定方法。
2. 前記酵素がエステル結合の加水分解反応を触媒することを特徴とする請求の範囲第1項記載の酵素反応測定方法。
3. 前記酵素がカルボン酸エステル加水分解酵素であることを特徴とする請求の範囲第2項記載の酵素反応測定方法。
4. 前記酵素がリパーゼであることを特徴とする請求の範囲第2項記載の酵素反応測定方法。
5. 基質溶液と酵素溶液とが混合されてなる測定溶液を容れる反応容器と、  
前記基質溶液を前記反応容器内に供給する基質溶液供給手段と、  
前記酵素溶液を前記反応容器内に供給する酵素溶液供給手段と、  
前記測定溶液の温度を制御する温度制御手段と、  
前記測定溶液を攪拌する攪拌手段と、  
前記測定溶液に接して配された全反射吸収用プリズムと、  
前記全反射吸収用プリズムと前記測定溶液との界面で全反射するように赤外光を前記全反射吸収用プリズムに入射させる赤外光源と、  
前記全反射吸収用プリズムから出射された赤外光のスペクトルを測定する赤外光検出手段と、  
前記赤外光検出手段により測定された前記赤外光のスペクトルに基づいて赤外線吸収スペクトルあるいは吸光度の変化を求めて、前記測定溶液中の酵素反応を測定する演算部と、

を備えることを特徴とする酵素反応測定装置。

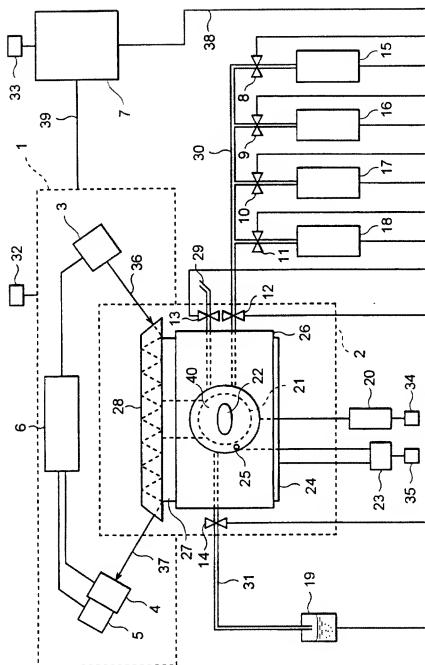
6. 前記反応容器内の前記測定溶液を排出する溶液排出手段と、

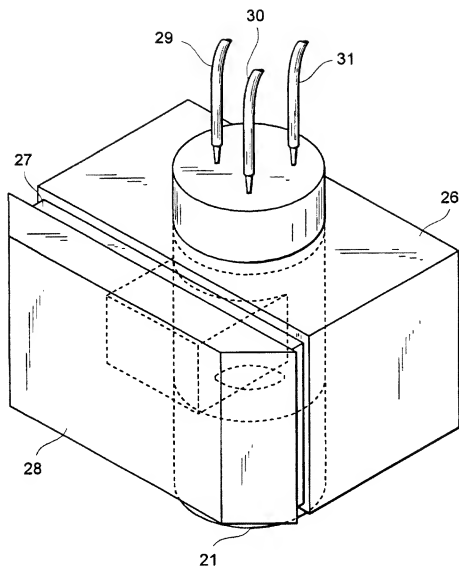
前記反応容器内を洗浄する洗浄液を前記反応容器内に供給する洗浄液供給手段と、

を更に備えることを特徴とする請求の範囲第5項記載の酵素反応測定装置。

7. 前記全反射吸収用プリズムは、少なくとも前記測定溶液に接触する領域がテフロン・コーティングされていることを特徴とする請求の範囲第5項記載の酵素反応測定装置。

Fig.1



**Fig.2**

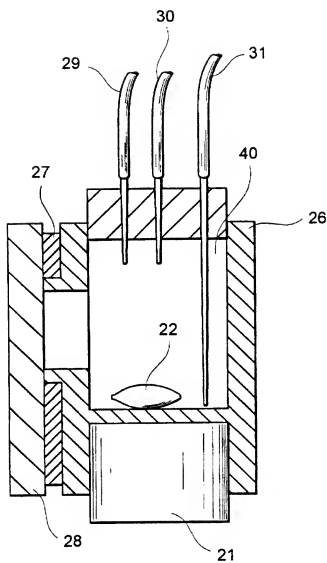
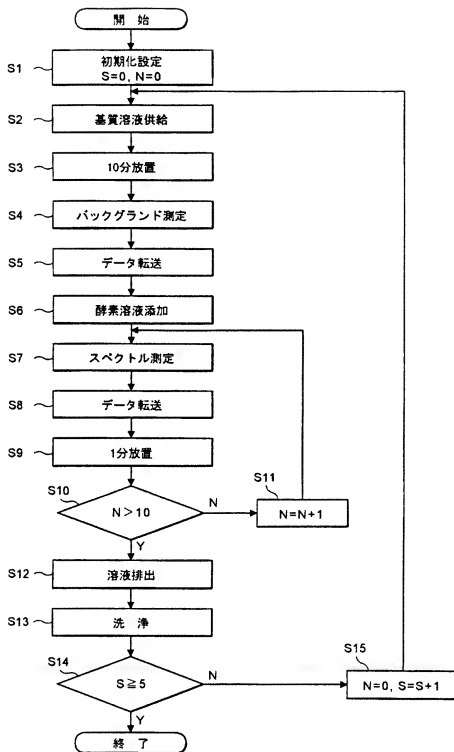
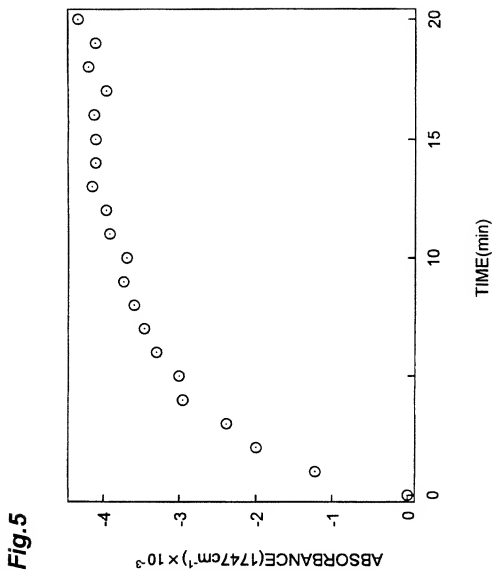
**Fig.3**

Fig.4







## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00513

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> G01N21/75, G01N21/78, G01N21/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> G01N21/75-83, G01N21/00-01, G01N21/17-21/61

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1996
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 5-60686, A (Kao Corp.), March 12, 1993 (12. 03. 93), Claim; paragraph (0012) (Family: none)	1 - 7
Y	Supervision of Kazutomo Imahori et al. "Dictionary of Biochemistry" K.K. Tokyo Kagaku Dojin (Tokyo), April 10, 1984 (10. 04. 84), Refer to "Lipase" section	1 - 7
A	JP, 6-102177, A (Nippon Steel Corp.), April 15, 1994 (15. 04. 94) (Family: none)	2 - 4
Y	JP, 6-242005, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), September 2, 1994 (02. 09. 94) (Family: none)	5 - 7
PX PY	JP, 8-145879, A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), June 7, 1996 (07. 06. 96) & EP, 714024, A1	1 2 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 7, 1997 (07. 03. 97)

Date of mailing of the international search report

March 25, 1997 (25. 03. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00513

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-263446, A (CIBA-Corning Diagnostics Corp.), October 31, 1988 (31. 10. 88) (Family: none)	7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> G01N21/75, G01N21/78, G01N21/27

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> G01N21/75-83, G01N21/00-01, G01N21/17-21/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 5-60686, A (花王株式会社) 12. 3月. 1993 (12. 03. 93), 特許請求の範囲, [0012] (ファミリーなし)	1-7
Y	今堀和友他監修「生化学辞典」(東京) 株式会社東京化学同人 10. 4月. 1984 (10. 04. 84) 「リパーゼ」の項参照	1-7
A	J P, 6-102177, A (新日本製鐵株式会社) 15. 4月. 1994 (15. 04. 94) (ファミリーなし)	2-4
Y	J P, 6-242005, A (住友電気工業株式会社) 2. 9月. 1994 (02. 09. 94) (ファミリーなし)	5-7
PX	J P, 8-145879, A (株式会社京都第一科学) 7. 6月. 1996 (07. 06. 96) & EP, 714024, A1	1
PY	J P, 63-263446, A (チバ コーニング ダイアグノスティクス コーポレーション) 31. 10月. 1988 (31. 10. 88) (ファミリーなし)	2-7
A		7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 03. 97

国際調査報告の発送日

25.03.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

熊美知康

2 J 9408

印

電話番号 03-3581-1101 内線3252